

Phosphate Analysis

Phosphate was analyzed according to the method described in „Photometrical Methods for the Eppendorf Photometer“ (11). This method proved superior to all other methods of phosphate analysis previously employed.

Measurement of the Intracellular and Extracellular Distribution of Inorganic Phosphate

Aliquots of the cell suspension were quickly removed at various times during the incubations. One-half of each aliquot was subjected directly to phosphate analysis. The other half was rapidly separated into packed cells and a cell-free supernatant by means of a specially built microcentrifuge. This centrifuge permitted complete separation in less than a minute. The supernatant thus obtained was also analyzed for inorganic phosphate. Two values for inorganic phosphate were thereby obtained — one of which representing the total inorganic phosphate of cells plus suspension

medium. The other value represented the inorganic phosphate content of the suspension medium alone. Simple subtraction of the second value from the first one permitted to obtain the inorganic phosphate of the cells as the difference between the two. To calculate the cellular concentration of inorganic phosphate additional data on the cell volume was required. The cell volume was determined by centrifugation in special cytocrit tubes and it was read after the packed cell volume became constant.

Since any volume of packed cells contains a certain amount of medium, a correction considering this volume was required. This volume was obtained from the literature (12) and it attributes to approximately 18% of the packed cell volume as determined by the cytocrit technique. All values of inorganic phosphate plotted in the diagrams have therefore been corrected for this 18% difference.

All plots in this paper represent the inorganic phosphate concentration of 1 ml of packed cells and of the corresponding medium volume in which 1 ml of packed cells was suspended.

References

1. WARBURG, O. and E. HIEPLER, Z. Naturforsch. 7b, 193 (1952). —
2. WARBURG, O., K. GAWEHN and G. LANGE, Z. Naturforsch. 9b, 109 (1954). —
3. WOODS, M. and D. BURK, Z. Naturforsch. 18b, 731 (1963). —
4. WEISS, E., J. Bact. (Baltimore) 90, 243 (1965). —
5. LYNEN, F., Liebig's Ann. Chem. 546, 120 (1941). —
6. JOHNSON, M. J., Science (New York) 94, 200 (1941). —
7. KIESOW, L., Z. Naturforsch. 16b, 567 (1961). —
8. KIESOW, L., Z. Naturforsch. 16b, 32 (1961). —
9. KIESOW, L., Z. Naturforsch. 15b, 487 (1960). —
10. WARBURG, O. and W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 303, 40 (1939). —
11. in: „Photometrische Methoden zum Photometer Eppendorf“, Netheler and Hinz, Hamburg (1960). —
12. RICE M. E. and E. SHELTON, J. Nat. Cancer Inst., Wash., 21, 961 (1954).

Lutz A. Kiesow
Naval Med. Res. Inst.
Bethesda, Maryland 20014, USA

Immunchemische Untersuchungen an Carboxylesterasen

Von P. HAIN¹⁾ und K. KRISCH

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Giessen

(Eingegangen am 16. April 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wird über immunchemische Untersuchungen (Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY, Immunelektrophorese) von drei hochgereinigten Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) verschiedener Herkunft (aus Schweineleber, Schweineniere und Rinderleber) berichtet. Durch Immunisierung von Kaninchen wurden Antiseren gegen Schweineleber- und Schweinenierenenzym erhalten. Schweineleberesterase verhält sich immunologisch einheitlich, während Schweinenierenesterase noch Spuren von mindestens zwei Fremdkomponenten erkennen läßt. Schweineleber- und Schweinenierenesterase verhalten sich im Ouchterlony-Test immunologisch identisch, unterscheiden sich jedoch quantitativ im Präzipitationsversuch mit steigenden Antigenkonzentrationen. Rinderleberesterase reagierte im vergleichenden Doppeldiffusionsversuch mit Antiserum gegen Schweineleberesterase unter Spornbildung; sie ist daher mit den beiden Esterasen vom Schwein immunologisch verwandt, aber nicht identisch. — Das aktive Zentrum der Carboxylesterasen ist an der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes nicht beteiligt.

Immunochemical studies (double diffusion after OUCHTERLONY, immunoelectrophoresis) are reported on three highly purified carboxylesterases (EC 3.1.1.1) of different origin (pig liver, pig kidney and bovine liver). Antisera to the pig liver and pig kidney enzymes were obtained by the immunisation of rabbits. Pig liver esterase was immunologically homogeneous, while the pig kidney esterase still contained traces of at least two contaminating compounds. In the Ouchterlony test, pig liver and pig kidney esterase are immunologically identical, but they show quantitative differences in the precipitation test with increasing concentrations of antigen. Bovine liver esterase gives trailing spurs in the comparative double diffusion test with antiserum to pig liver esterase; it is therefore related to but not identical with the two pig esterases. The active centre of the carboxylesterases is not involved in the formation of the antigen-antibody complex.

In den vergangenen Jahren haben wir drei hochgereinigte Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber (1), Schweineniere (2, 3) und Rinderleber (4) isoliert. Die drei Präparationen stimmen in vielen Eigenschaften überein (Verhalten bei Säulenchromatographie, Ammoniumsulfatfällung, Molekulargewicht, Zahl der aktiven Zentren, pH-Optimum u. a.). Andererseits haben wir einige Unterschiede beobachtet, z. B. in den

Wechselzahlen gegen verschiedene Substrate, im Verhalten gegen einige Inhibitoren und in der Stabilität bei niedrigen pH-Werten. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, inwieweit die drei Enzymproteine identisch sind. Zur Klärung dieses Problems bieten sich neben Methoden der Proteinchemie immunologische Verfahren an. In der vorliegenden Arbeit wird über einige Ergebnisse zur immunologischen Reinheit und Verwandtschaft von Carboxylesterasen verschiedener Herkunft berichtet.

¹⁾ Aus der Doktorarbeit von cand. med. PETER HAIN.

Methodik

Immunisierung

Zur Gewinnung der Antiseren wurden Kaninchen mit Schweineleber- bzw. Schweinenierenenzym zusammen mit komplettem FREUNDschen Adjuvans intracutan (später auch subcutan) injiziert. Es wurden etwa 8 Injektionen von je 0,4 mg Enzymprotein in Abständen von einer Woche verabfolgt. 14 Tage nach der letzten Injektion wurde erneut 1 mg Enzymprotein injiziert („Boosterung“) und nach weiteren 6–10 Tagen Blut aus der Ohrvene entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde entweder direkt verwendet oder gefriergetrocknet (5). Kontrollen des Antikörpertiters erfolgten in Anlehnung an die Methode der optimalen Proportionen (6, 7).

Ouchterlony-Teste

Die Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY (8) wurden entweder in Petrischalen mit rosettenförmiger Anordnung der Stanzlöcher oder in der Mikrotechnik auf Objektträgern durchgeführt. Als Konservierungsmittel setzten wir dem Gel 0,01% Merthiolat (Eli Lilly GmbH, Gießen) zu. Wir folgten bis auf geringe Änderungen der in l. c. (9) angegebenen Arbeitsvorschrift. Alle Versuche wurden mit 1proz. Reinagar der Behringwerke (Marburg/Lahn) durchgeführt.

Antikörper-Absorptionsteste

Aus einer Agarschicht wurden zwei parallele Gräben ausgehoben und drei runde Löcher so ausgestanzt, daß sie zu beiden Gräben den gleichen Abstand haben (entsprechend der in Abb. 1 dargestellten Versuchsanordnung). In den oberen Gräben wurde zum Vergleich AS-Schweineleberenzym²⁾ eingefüllt. Der untere Graben wurde mit AS-Schweineleberenzym beschickt, das mit einem Überschuß an Schweineleber-, Schweinenieren- oder Rinderleberenzym eine Stunde bei 37° vorinkubiert worden war.

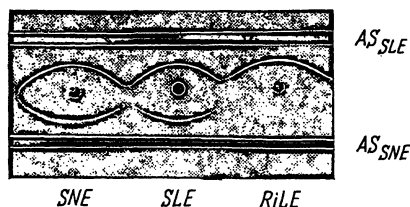


Abb. 1

Vergleichende radiale Doppeldiffusion (Mikroverfahren auf Objektträger) von Schweinenieren- (SNE), Schweineleber- (SLE) und Rinderleber- (RILE) Esterase gegen AS-Schweineleberesterase (AS_SLE, oberer Graben) und AS-Schweinenierenesterase (AS_SNE, unterer Graben).

Das linke Loch enthält SNE, das mittlere SLE und das rechte RILE (Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml)

Immunoelektrophorese

Die Immunelektrophoresen wurden mit der Objektträgermethode nach SCHEIDEGGER (10) nach den Angaben von GUNDLACH (5) mit der Apparatur der Firma LKB (Stockholm/Schweden) durchgeführt. Wir überprüften die Methodik zunächst mit Humanserum und Antihumanserum vom Kaninchen (Behringwerke); dabei ergaben sich die bekannten Präzipitationszonen.

Substratfärbung der Immunpräzipitate

Die Substratfärbung auf esteraseaktive Präzipitationslinien im Gel erfolgte mit der Methode von URTEL (11) nach der Beschreibung von BACKHAUSZ (12). Als Substrat wurde α -Naphthylacetat (statt β -Naphthylacetat) verwandt. Wegen der hohen Aktivitäten

²⁾ Abkürzungen: AS-Schweineleberenzym = Antiserum vom Kaninchen gegen Schweineleberesterase (bzw. Schweinenierenesterase).

E 600 = Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat.

Merthiolat = Na-Äthylmercurithiosalicat.

unserer Esterasen gegen diese Substrate wurde die Inkubationszeit wesentlich verkürzt (0,5–2 Min. statt 30–60 Min.).

Quantitative Präzipitationsversuche

Wir bestimmten das Immunpräzipitat im Prinzip nach SCHULZE und SCHWICK (13), variierten jedoch Volumina, Reaktionszeit und Schichtdicke der Küvetten. Die Ansätze (in Mikrozentrifugenröhrchen) enthielten jeweils 0,1 ml AS-Schweineleberenzym, 0,1 ml Antigenlösung (entsprechender Verdünnung) und m/15 Phosphatpuffer pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml. Es wurde 60 Min. bei 37° inkubiert und anschließend 24 Std. bei 0–4° stehengelassen. Nach gleichmäßiger Durchmischung der Ansätze mit einem Rüttelmischer wurden die Extinktionen in 0,5 cm Küvetten im Zeiss-Spektralphotometer PM Q II bei 450 nm gemessen. Die Ansätze wurden danach wieder in Mikrozentrifugenröhrchen zurückgefüllt und in der „Mikrofuge“ (Mikrolitersystem „Eppendorf“, Firma Netheler und Hinz, Hamburg) 2,5 Min. lang zentrifugiert.

Bestimmung der Enzymaktivität

Die Esteraseaktivität des Überstandes wurde mit o-Nitrophenylacetat als Substrat nach l. c. (14) bestimmt.

Ergebnisse

1. Prüfung der Enzympräparationen auf Einheitlichkeit

Vergleichende radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY

Immunologische Methoden gehören zu den empfindlichsten Kriterien zur Beurteilung der Reinheit von Proteinen. Dabei unterrichtet die Anzahl der Präzipitationszonen über die Mindestzahl der reagierenden Antigen-Antikörper-Systeme. In Vorversuchen ermittelten wir die jeweils optimalen Konzentrationen von Antigen und Antiserum. Die Antiseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen.

Wenn man die Antigene Schweineleber-, Schweinenieren- und Rinderleberenzym im Mikroverfahren auf Objektträgern gegen AS-Schweineleberenzym bzw. AS-Schweinenierenenzym diffundieren läßt, ergibt sich das in Abbildung 1 dargestellte Bild. Man erkennt, daß alle drei Esterasepräparationen mit AS-Schweineleberenzym unter Ausbildung scharfer, einheitlicher Präzipitationszonen reagieren (obere Bildhälfte). Gegen AS-Schweinenierenenzym ergibt die Schweineleberesterase eine einheitliche Bande. Rinderleberenzym zeigt unter diesen Bedingungen keine Präzipitation, während Schweinenierenenzym — also das homologe Antigen — neben einer deutlichen Hauptbande noch eine schwache Nebenbande erkennen läßt. Das Antigen-Antikörper-Präzipitat ist noch enzymatisch aktiv (s. u., Abschnitt 4). Daher kann durch eine „Substratfärbung“ mit α -Naphthylacetat entschieden werden, ob eine Präzipitationslinie auf dem Vorhandensein von Esterase oder von nicht-aktivem Begleitprotein beruht. Die schwache bei der Diffusion von Schweinenierenenzym gegen sein homologes Antiserum erhaltene Nebenbande ist, wie die „Substratfärbung“ ergab, auf nicht aktives Fremdprotein zurückzuführen. Dagegen färbt sich die Hauptbande des Schweinenierenenzyms (ebenso wie alle anderen Banden der Abb. 1) stark an. Wie zu erwarten, lassen sich alle Banden auch in der Proteinfärbung mit Säurefuchsin darstellen.

Während sich demnach das Schweineleberenzym unter diesen Bedingungen immunologisch einheitlich verhält, ist die Schweinenierenesterase noch mit mindestens einem Begleitprotein verunreinigt.

Prinzipiell gleiche Ergebnisse werden auch mit dem „Makro“-Ouchterlony-Verfahren (in Petrischalen mit rosettenförmiger Anordnung der Stanzlöcher) erhalten. Auch dabei reagiert Schweineleberenzym mit AS-Schweineleberenzym unter Ausbildung einer scharfen, geradlinigen Präzipitationszone etwa in der Mitte zwischen den beiden Löchern. Nach BACKHAUSZ (12) ergeben sich im Ouchterlony-Test gerade Linien, wenn die Diffusionskonstanten der beiden Reaktionspartner etwa gleich sind. Dies ist in unserem System annähernd der Fall: der $D_{20,w}^0$ -Wert beträgt für Schweineleberesterase 4,6 (15) und für 7 γ -Globulin vom Rind 4,1 (16). Das Molekulargewicht unserer Carboxylesterasen (167 000 (3, 4, 15)) ist mit dem der 7 γ -Globuline fast identisch.

Immunelektrophorese

Bei der Beurteilung der Einheitlichkeit von Proteinen ist die Immunelektrophorese der Doppeldiffusion weit überlegen. Auf Grund der vorangegangenen elektrophoretischen Trennung der Antigene ist hier die Wahrscheinlichkeit, daß sich zwei Präzipitationslinien zufällig decken, wesentlich geringer.

Die Ergebnisse immunelektrophoretischer Untersuchungen mit Schweineleber- und Schweinenierenenzym sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Aus Abbildung 2

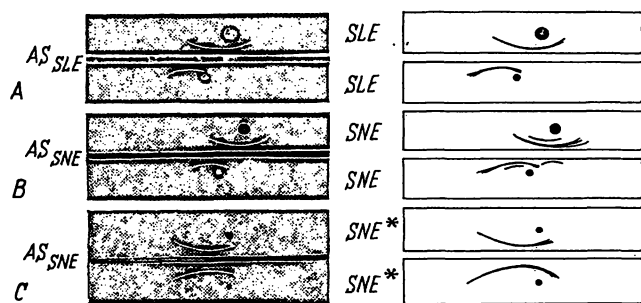


Abb. 2

Immunelektrophorese von Schweineleberesterase (SLE) und Schweinenierenesterase (SNE)

Anode links, Kathode rechts. AS = Antiserum (im Graben)

SNE* = Schweinenierenesterase nach weiterer Reinigung durch Rechromatographie und Ammoniumsulfatfällung

Die obere und untere Hälfte der beiden Objektträger A und B unterscheiden sich nur in der Größe des Antigenloches, wobei im oberen Teil das jeweils 5fache Volumen Enzym einpipettiert wurde. Obere und untere Hälfte von C sind identisch

Der besseren Übersicht halber ist im rechten Teil der Abbildung eine schematische Zeichnung der Präzipitationslinien wiedergegeben

geht hervor, daß Schweineleberenzym (gegen AS-Schweineleberesterase) auch immunelektrophoretisch nur eine Präzipitationslinie erkennen läßt. Demgegenüber zeigt nach unserem üblichen Verfahren isoliertes (2, 3) Schweinenierenenzym gegen sein homologes Antiserum neben der Hauptbande noch eine weitere, im Bereich höherer Antigenkonzentrationen liegende schwache Nebenbande, außerdem noch eine sehr feine dritte und vierte, die rechts an die Hauptbande anschließen (B). Diese Verunreinigungen, die keine Esteraseaktivität zeigen, können durch weitere Reinigung des Nierenenzyms (nochmalige Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 und Ammoniumsulfatfällung) weitgehend entfernt werden. Im Teil C der Abbildung 2

sind sie nicht mehr nachweisbar. Bei sehr hohen Antigenkonzentrationen und langen Diffusionszeiten sind jedoch auch in diesem Fall immer noch zwei sehr schwache Nebenbanden angedeutet erkennbar. Die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten von Schweineleber- und Schweinenierenesterase sind bei der Immunelektrophorese etwa gleich. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Befunden (Papierelektrophorese und Hochspannungselektrophorese auf Stärkegel (2, 3)).

2. Untersuchungen zur Frage der immunologischen Identität bzw. Verwandtschaft

Aus Abbildung 1 (oben) geht hervor, daß die Präzipitationsbanden von Schweineleber- und Schweinenierenenzym (gegen AS-Schweineleberenzym) konfluieren. Schweineleber- und Rinderleberesterase zeigen dagegen nur eine partielle Konfluenz unter deutlicher Spornbildung, wobei die Bande des Schweineleberenzym durchläuft. Das gleiche Verhalten (partielle Konfluenz mit Spornbildung) im vergleichenden Doppeldiffusionsversuch wird auch zwischen den Banden von Rinderleber- und Schweinenierenenzym beobachtet.

Bei Diffusion der drei Enzympräparationen gegen AS-Schweinenierenenzym ergibt sich das in der unteren Hälfte der Abbildung 1 dargestellte Bild. Auch in diesem Fall gehen die Banden von Schweineleber- und Schweinenierenenzym kontinuierlich ohne Spornbildung ineinander über. Mit Rinderleberesterase läßt sich dagegen — überraschenderweise — keine Präzipitationsbande erkennen. Färbt man das Präparat jedoch mit der hochempfindlichen „Substratfärbung“ (s. u.) an, so wird auch in diesem Fall eine Bande erkennbar.

Zur Ergänzung dieser Befunde haben wir noch einige weitere Versuche durchgeführt, bei denen AS-Schweineleberenzym zur Absorption der Antikörper mit einem Überschuß jedes der drei Antigene vorinkubiert wurde. Das gebildete Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand im Doppeldiffusionsversuch gegen Schweineleber-, Schweinenieren- und Rinderleberesterase untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

a) Keines der Antigene bildet gegen AS-Schweineleberesterase, das mit Schweineleberenzym (also seinem homologen Antigen) vorinkubiert wurde, eine Bande.

b) Auch mit Schweinenierenenzym vorinkubiertes Antiserum gegen Schweineleberesterase reagiert mit keinem der drei Antigene.

c) Bei Diffusion von Schweinenieren-, Schweineleber- und Rinderleberesterase gegen AS-Schweineleberenzym, das mit einem Überschuß an Rinderleberenzym vorinkubiert wurde, zeigen sich schwache Banden (etwa gleicher Intensität) gegen Schweinenieren- und Schweineleberenzym als Antigene; gegen Rinderleberenzym bildet sich dagegen keine Bande mehr aus.

3. Quantitative Immunpräzipitations-Kurven

Antiserum gegen Schweineleberenzym wird mit steigenden Mengen Schweineleber- bzw. Schweinenierenenzym als Antigen inkubiert und das gebildete Immun-

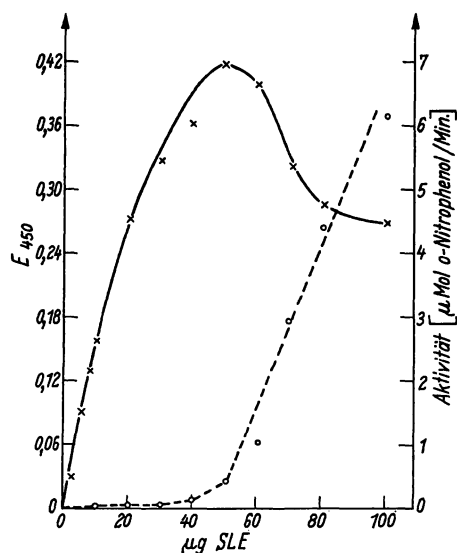


Abb. 3

Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung ($\times-\times$) und der Esteraseaktivität im Überstand ($\circ-\circ$) in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration (Schweineleberenzym). Die Antikörperkonzentration (AS-Schweineleberenzym vom Kaninchen) wurde konstant gehalten. Volumen 1,2 ml

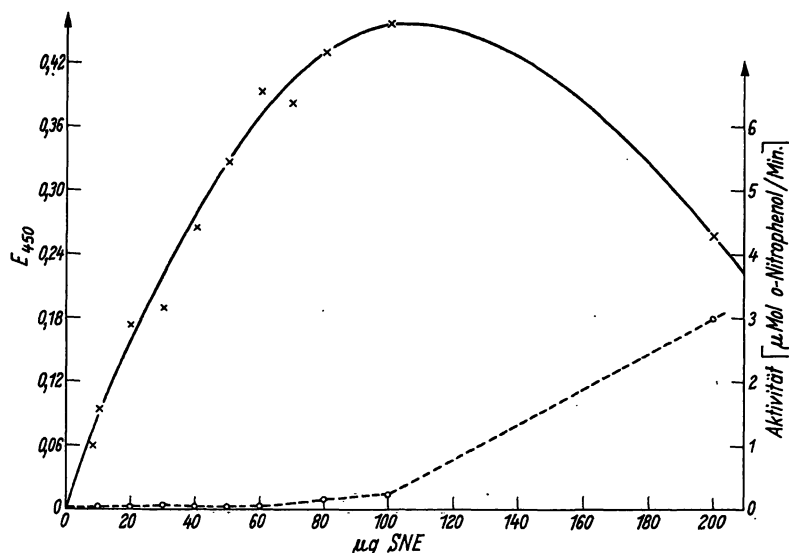


Abb. 4

Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung ($\times-\times$) und der Esteraseaktivität im Überstand ($\circ-\circ$) in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration. Als Antigen wurde in diesem Versuch Schweinenierenenzym eingesetzt. Übrige Bedingungen wie in Abbildung 3

präzipitat an Hand der Trübung quantitativ bestimmt. Ferner wird nach Abzentrifugieren des Antigen-Antikörper-Präzipitates die Esteraseaktivität (Substrat *o*-Nitrophenylacetat) im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. In Abbildung 3 werden die mit Schweineleberenzym als Antigen erhaltenen Kurven gezeigt. Die Kurve der Trübung ergibt einen typischen Verlauf mit zunächst steilem Anstieg der Präzipitatenmenge, einem Maximum (Äquivalenzpunkt) bei etwa 50 μg Schweineleberenzym und anschließendem Abfall. Letzterer ist, wie auch für zahlreiche andere immunologische Systeme bekannt ist, auf eine teilweise Auflösung des Antigen-Antikörper-Präzipitates im Antigenüberschuß zurückzuführen. Im ansteigenden Teil der Kurve, d. h. bei Antikörperüberschuß, ist keine Esteraseaktivität im Überstand nachweisbar. Dagegen beginnt die Enzymaktivität mit dem Überschreiten des Äquivalenzpunktes steil anzusteigen.

Einen analogen Versuch mit Schweinenierenenzym als Antigen zeigt Abbildung 4. Es fällt auf, daß in diesem Fall die doppelte Menge Antigen, nämlich etwa 100 μg Schweinenierenenzym, zur quantitativen Präzipitation der gleichen Antikörpermenge (AS-Schweineleberenzym) benötigt werden.

4. Versuche zur Frage der Beziehungen zwischen Antikörperbindung und aktivem Zentrum von Carboxylesterasen

Native Enzyme

Die durch Reaktion von Schweineleberenzym (bzw. Schweinenierenenzym) mit homologem Antiserum erhaltenen Immunpräzipitate sind noch enzymatisch aktiv. Dies kann durch eine „Substratfärbung“ der Präzipitationslinien im Gel mit α -Naphthylacetat nachgewiesen werden. An den Stellen, wo das Substrat enzymatisch

gespalten wird, entsteht α -Naphthol, das dann mit einem Diazoniumsalz zu einem schwerlöslichen Azofarbstoff umgesetzt wird (11, 12). Mit dieser sehr empfindlichen Färbung ergeben Esterasen intensiv braunrote scharfe Banden, während Immunpräzipitate anderer Proteine, z. B. die Nebenbanden in Abbildung 2B, nicht reagieren. Wir haben diese „Substratfärbung“ ferner zur Kontrolle mit einem immunoelektrophoretisch aufgetrenntem Serum durchgeführt. Dabei färbte sich nur die Bande des Albumins (das geringe Esteraseaktivität hat) nach wesentlich längerer Inkubationszeit schwach an.

Die Esteraseaktivität des Antigen-Antikörper-Präzipitates läßt sich auch wie folgt nachweisen: Antigen (z. B. Schweineleberenzym) und Antiserum werden in einem Zentrifugenglas gemischt; das Präzipitat wird abzentrifugiert und nach mehrfachem Nachwaschen (0,9proz. NaCl) mit Substrat, z. B. Acetanilid, inkubiert. Ebenso wie im Versuch mit freiem Enzym kann die Esteraseaktivität auch im Antigen-Antikörper-Präzipitat durch E 600 (10^{-5}M) vollständig gehemmt werden. —

Phosphorylierte Enzymderivate

Durch Behandlung von Carboxylesterasen mit E 600 (14) oder Phosphorsäure-bis-[*p*-Nitrophenyl]ester (17) erhält man inaktive, phosphorylierte Enzymderivate. Es war die Frage, ob diese noch mit homologem Antiserum unter Präzipitatbildung reagieren können. Es zeigte sich in zahlreichen Versuchen, daß die Blockierung des aktiven Zentrums durch Organophosphatinhibitoren die Fähigkeit mit Antikörpern zu reagieren nicht beeinträchtigt.

Einfluß von Photooxydation, Dodecylsulfat und Hitzedenaturierung

Schweineleberesterase reagiert nach Photooxydation in Gegenwart von Methylenblau (18), sowie nach Behand-

lung mit Natriumdodecylsulfat und Hitzedenaturierung *nicht* mehr unter Präzipitatbildung mit homologem Antiserum.

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, daß sich Schweineleberesterase auch nach immunologischen Kriterien (Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY und Immunelektrophorese) einheitlich verhält. Dagegen enthält nach unserer üblichen Vorschrift isoliertes Schweinenierenenzym (2, 3) immunologisch noch 2—3 Fremdkomponenten (wahrscheinlich Proteine), die sich mit der „Substratfärbung“ nicht darstellen lassen. Durch weitere Reinigung der Schweinenierenesterase konnten diese zwar weitgehend, jedoch nicht vollständig entfernt werden. Die Nebenbanden waren bei den reinsten Präparationen nur unter bestimmten Bedingungen (sehr hohe Antigenkonzentrationen, lange Diffusionszeiten) noch angedeutet erkennbar. Eine quantitative Abschätzung dieser Begleitproteine ist schwierig. Wahrscheinlich spielen sie jedoch mengenmäßig keine große Rolle. Wir haben früher gezeigt, daß sich auch Schweinenierenesterase (ebenso wie die analogen Enzyme aus Schweine- und Rinderleber) nach verschiedenen anderen Kriterien (u. a. Ultrazentrifugation, Hochspannungselektrophorese in Stärkegel) einheitlich verhält (1, 2, 3, 4). An diesem Beispiel wird erneut die hohe Empfindlichkeit immunologischer Methoden bei der Reinheitsprüfung von Proteinen deutlich.

Über die Frage der Identität der drei isolierten Enzymproteine wird zur Zeit in unserem Laboratorium intensiv gearbeitet (u. a. mit Aminosäureanalysen, Endgruppenbestimmungen und „Fingerprint“-Untersuchungen tryptischer Spaltpeptide). Über die Ergebnisse soll später an anderer Stelle zusammenfassend berichtet werden. Aus den hier mitgeteilten immunologischen Ergebnissen zu diesem Problem lassen sich derzeit folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Wie die Konfluenz ihrer Präzipitationslinien im vergleichenden Doppeldiffusionsversuch zeigt (Abb. 1), erscheinen Schweinenieren- und Schweineleberesterase bei der Reaktion mit Antiserum vom Kaninchen immunologisch identisch. Dies wurde auch durch die Absorptionsversuche bestätigt, bei denen AS-Schweineleberenzym mit Schweineleber- bzw. Schweinenierenesterase vorinkubiert wurde. So kann Schweinenierenenzym alle Antikörper des AS-Schweineleberenzym binden, so daß sich danach keine Bande gegen Schweineleberesterase mehr ausbilden kann. Umgekehrt erhält man auch nach Reaktion von Schweineleberenzym mit AS-Schweineleberenzym keine Präzipitation mehr mit Schweinenierenenzym.

2. Das Ergebnis der quantitativen Präzipitationsversuche (Abb. 3 und 4) spricht jedoch dafür, daß die Anzahl der Antikörper-bindenden Gruppen (Epitope) beim Schweineleberenzym größer sein muß, da mit Schweineleberenzym nur etwa die halbe Menge Antigen bis zum

Äquivalenzpunkt benötigt wird wie im gleichen Versuch mit Schweinenierenenzym (Abb. 4).

3. Rinderleberenzym einerseits, sowie Schweinenieren- und Schweineleberenzym andererseits, sind immunologisch nicht identisch. Die Präzipitationslinie von Rinderleberenzym mit AS-Schweineleberenzym zeigt eine Spornbildung mit den Linien von benachbarter Schweineleber- und Schweinenierenesterase. Daraus folgt, daß Schweineleber- (und Schweinenierenenzym) mit Rinderleberenzym einen Teil der Epitope gemeinsam haben, also immunologisch verwandt sind.

Überraschend ist die Beobachtung, daß Rinderleberenzym mit AS-Schweinenierenenzym keine bzw. nur eine sehr schwache Präzipitation ergibt (Abb. 2, rechts unten). Wie erwähnt, sind Schweineleber- und Schweinenierenenzym, zumindestens qualitativ, immunologisch identisch. Danach könnte erwartet werden, daß auch AS-Schweinenierenenzym (ebenso wie AS-Schweineleberenzym) mit Rinderleberenzym präzipitiert werden kann. Wahrscheinlich ist dies kein prinzipieller, sondern nur ein quantitativer Unterschied, da sich mit der hochempfindlichen „Substratfärbung“ noch eine Bande (von Rinderleberenzym gegen AS-Schweinenierenenzym) nachweisen läßt. Hierfür spricht auch der Absorptionsversuch: Die Bande von Schweinenierenenzym gegen AS-Schweineleberenzym wird, ebenso wie die des Schweineleberenzym, durch vorherige Inkubation des Antiserums mit einem Überschuß an Rinderleberenzym stark abgeschwächt, d. h. das Rinderleberenzym bindet den größten Teil der Antikörper gegen die beiden immunologisch gleichen Antigene Schweineleber- und Schweinenierenesterase. Warum nun umgekehrt Antikörper gegen Schweinenierenenzym mit Rinderleberenzym so viel schwächer reagieren, bedarf noch weiterer Klärung.

Diese immunochemischen Ergebnisse stimmen mit früher mitgeteilten Befunden insofern überein, als sich auch nach enzymologischen Kriterien Schweineleber- und Schweinenierenesterase — also Enzym der gleichen Tierart — sehr ähnlich verhielten, während Schweineleber- und Rinderleberesterase — also Proteine von zwei verschiedenen Tierarten — deutlichere Unterschiede zeigten (2, 3, 4). Welche Unterschiede dem in der Aminosäurezusammensetzung und Sequenz, bzw. in der Konformation der drei Enzymproteine zugrunde liegen, wird durch künftige Untersuchungen geklärt werden müssen.

Nach unseren Befunden sind die Antigen-Antikörper-Präzipitate von Carboxylesterase noch enzymatisch aktiv. Dies ist auch für eine Reihe anderer Enzyme bekannt und wurde z. B. von GUNDLACH (5) am Chymotrypsin eingehend untersucht. Die in Abschnitt 4 geschilderten Ergebnisse zeigen, daß die Reaktion des Substrates (bzw. des Organophosphat-Inhibitors E 600) mit dem aktiven Zentrum von Carboxylesterasen durch die Bindung von Antikörpern nicht beeinträchtigt wird. Hiermit steht in Übereinstimmung, daß — umgekehrt — durch Organophosphat-Inhibitoren am aktiven Zentrum

blockierte Esterasen noch mit ihren homologen Antisera reagieren können. Demnach müssen für die Reaktion mit Antikörpern andere, nicht am aktiven Zentrum beteiligte Bezirke des Enzymproteins verantwortlich sein.

Es wäre von großem Interesse, Näheres über die Art der Bindungen und der für die Antigen-Antikörper-Reaktion maßgeblichen Gruppen des Enzyms zu wissen, doch existieren hierüber auch bei anderen Immunsystemen noch kaum Angaben. Weitere quantitative

Untersuchungen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Carboxylesterasen im Antigen-Antikörper-Komplex und zur Stöchiometrie der Antigen-Antikörper-Reaktion sind geplant.

Frau Dr. GRÖSCHEL-STEWART, Würzburg, sowie den Behring-Werken, Marburg/Lahn, sind wir für ihre freundliche Unterstützung bei der Einarbeitung in die immunologische Methodik zu Dank verpflichtet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten durch Sachbeihilfen.

Literatur

1. KRISCH, K., Biochem. Z. 337, 531 (1963). — 2. FRANZ, W. und K. KRISCH, Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 816 (1966). — 3. FRANZ, W. und K. KRISCH, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. (im Druck). — 4. BENÖHR, H. C. und K. KRISCH, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1102, 1115 (1967). — 5. GUNDLACH, G., Habilitationsschrift, Med. Fakultät Würzburg (1964). — 6. DEAN, H. R. und R. A. WEBB, J. Path. Bact. 31, 89 (1928). — 7. KABAT, E. A. und M. M. MAYER, „Experimental Immunochimistry“, Charles C. Thomas Springfield/Ill. (1961). — 8. OUCHTERLONY, Ö., Ark. Kem., Mineralog. Geol., Ser. B 26, 1 (1948). — 9. SCHWICK, G. und K. STÖRIKO, „Laboratoriumsblätter für die med. Diagnostik“, Mai 1964, Behringwerke AG, Marburg/Lahn. — 10. SCHEIDT, J., Internat. Arch. Allergy 7, 103 (1955). — 11. URIEL, J., Ann. Inst. Pasteur, Paris 101, 104 (1961). — 12. BACKHAUSZ, R., „Immunodiffusion und Immunelektrophorese, Gustav Fischer, Jena (1967). — 13. SCHULZE H. E. und G. SCHWICK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 4, 15 (1959). — 14. KRISCH, K., Biochem. biophys. Acta (Amsterdam) 122, 265 (1966). — 15. BOGUTH, W., K. KRISCH und H. NIEMANN, Biochem. Z. 341, 149 (1965). — 16. „Biochem. Taschenbuch“, Hrsg. H. M. Rauen, 1. Aufl. S. 236 Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956). — 17. HEYMANN E. und K. KRISCH, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 609 (1967). — 18. KRISCH K. und E. PAHLICH, unveröffentlichte Versuche.

Prof. Dr. K. Krisch
63 Gießen
Friedrichstr. 24

Leberenzyme bei akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung

Ein Beitrag zum Mechanismus der Serumenzymveränderungen

Von H. KRÖNER und W. STAIB

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 20. April 1968)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wurde die Aktivität verschiedener Leberenzyme von Ratten kurzfristig nach i. p. Injektion von CCl_4 gemessen, und zwar einmal die Gesamtaktivität im Gewebe und ferner die Aktivität im 100 000 g Überstand. Das Fehlen nennenswerter Aktivitätsänderungen der lysosomalen Enzyme spricht gegen eine primäre Beteiligung der Lysosomen bei der CCl_4 -Vergiftung. Ein akuter Abfall der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität weist auf die Bedeutung der Mikrosomen hin. Die Aktivitätszunahme jener Leberenzyme, die nach Gabe von CCl_4 im Serum stark erhöht gefunden werden, konnte in einer zweiten Versuchsserie bestätigt werden. Dieser gleichzeitige Aktivitätsanstieg in Leber und Serum spricht gegen einen Membraneffekt und zusammen mit einer Zunahme des löslichen Protein in der Leber für Veränderungen der Enzymproteine als Ursache für den Serumenzymanstieg bei der akuten Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.

The activities of various rat liver enzymes (total activity in the tissues and the activity in the 100,000 g supernatant) were measured a short time after the i. p. injection of CCl_4 . Since there was no significant change in the activity of the lysosomal enzymes, the lysosomes cannot be primarily concerned in the CCl_4 poisoning. A marked decrease in the activity of glucose-6-phosphatase indicates that the microsomes are involved. It was confirmed in a second series of experiments that those enzymes, which show a marked increase in the serum, after CCl_4 , are also increased in the liver. This concomitant increase in the liver and serum, and the increase in the soluble protein of the liver, suggest that this is not a membrane effect, but the increase in serum enzymes in acute carbon tetrachloride poisoning is caused by changes in the enzyme proteins.

In früheren Untersuchungen konnten wir mit intraperitonealer Injektion von 2,4-Dinitrophenol (1), Monojodacetat (1) bzw. Äthionin (2) zwar einen zum Teil erheblichen Abfall der energiereichen Phosphate in der Leber erzielen, wir beobachteten aber im Gegensatz zu BRUNS und Mitarbeitern (3) nur einen geringfügigen Anstieg einzelner Serumenzyme. Nur bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung fanden auch wir eine erhebliche Zunahme der Serumenzymaktivitäten (2). Die energie-

reichen Phosphate der Leber fielen jedoch nach Gabe von Tetrachlorkohlenstoff erst ab, nachdem die Serumenzyme bereits signifikant erhöht waren. Damit müßte man die Abnahme des Energiepotentials aus einem allgemeingültigen Schema für den Mechanismus der Enzymausschüttung ausklammern (4).

Es stellt sich dann die Frage nach Membranveränderungen (eventuellen Porenöffnungen) beim Mechanismus der Enzymfreisetzung (5, 6). Von besonderem